

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10256

研究課題名(和文) 有棘細胞癌の発症及び転移に関するシグナル伝達系の解析

研究課題名(英文) Analysis of signaling pathway in squamous cell carcinoma

研究代表者

原田 和俊 (HARADA, KAZUTOSHI)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20324197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルは個体発生、細胞の分化・増殖、発癌に関する重要なシグナルカスケードであるが、皮膚悪性腫瘍の発生における機能は完全に解明されていない。今回、我々はWntシグナルを抑制するAPC遺伝子を表皮特異的に欠損させるマウスを作成し、皮膚腫瘍の発生におけるWntシグナルの機能を検討した。DMBAとTPAをマウスの皮膚に塗布すると皮膚腫瘍を発生させることが可能であり、実験系として確立している。表皮特異的APC欠損マウスにこれらの薬剤を外用し、皮膚腫瘍を発生させたところ、腫瘍の発生数に変化がみられなかった。しかし、病理組織学的に解析したところ、毛嚢由来の皮膚腫瘍であることが、判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紫外線などの影響により、遺伝子が傷つき、その結果、皮膚ガンが発生するが、遺伝子は多数あり、どの遺伝子が皮膚ガン発症に重要なのかは不明である。我々は、皮膚の細胞だけに、特定の遺伝子へ異常を導入したマウスを作成し、人工的に腫瘍を発生させる化学物質を塗布して、腫瘍の発生数の変化や性質を調べた。その結果、毛が作られる際に重要な遺伝子が腫瘍の発生頻度は変化させないが、腫瘍の性質を変化させることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling pathway has a pivotal role in embryogenesis, differentiation and growth of cells and carcinogenesis; however, the function of the signaling in skin tumorigenesis remains to be elucidated. Here, we investigated the function of Wnt signaling in skin carcinogenesis by epidermis specific APC gene, an inhibitor of Wnt signal, deleted mice. DMBA-TPA, chemical inducers of skin tumor, were repeatedly applied in epidermis of APC deficient mice. The skin tumor developed in the mice; however, the number of tumors was not altered in APC gene deleted mice. Interestingly, the histological examination revealed that the tumors in APC deficient mice mimicked the hair follicle structure. These findings indicated that Wnt signaling determined the differentiation of skin tumor.

研究分野：皮膚腫瘍

キーワード：Wntシグナル 組織特異的遺伝子欠損 毛包 皮膚腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

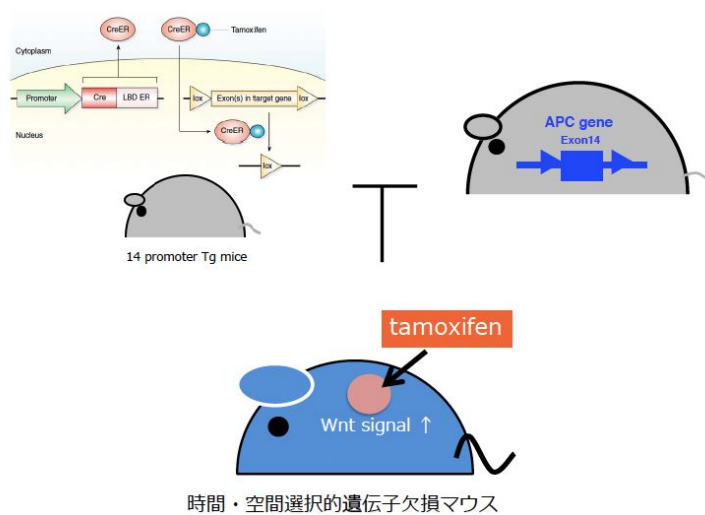
分子生物学や遺伝子工学を用いた検索により、皮膚悪性腫瘍において、基底細胞癌と悪性黒色腫の遺伝子変異やシグナル伝達の異常が明らかとなってきた。さらに、その結果、発症機序に基づいた分子標的薬が実際の臨床の場でも使用されるようになり、患者の生存期間は延長され、QOLの改善が達成されている。しかし、皮膚有棘細胞癌(SCC)では発症に関与すると考えられる遺伝子変異は報告されてはいるものの、発症メカニズムをシグナル伝達系の異常として理解できるレベルには達しておらず、今後もより詳細な研究が必要である。さらに毛嚢、脂腺などの皮膚付属器を由来とし、高齢者に発症頻度が高い皮膚付属器悪性腫瘍に関しては、発症機構の解析はほとんど行われておらず、発症メカニズムは依然として不明のままである。

### 2. 研究の目的

本研究ではSCC及び皮膚付属器由来の悪性腫瘍の発症メカニズムをシグナル伝達系の異常として理解することを目的とする。具体的には、個体発生、腫瘍発生に重要な役割を演ずることが解明されているWntシグナル伝達系が、SCC及び皮膚付属器由来悪性腫瘍の発生および進展において、大きな役割を担っているという仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

Wntシグナルを時間・部位特異的に活性化させたマウスを作製する。具体的にはWntシグナルのエクソン14がLoxP配列で挟まれたconditional targetingマウスと、ケラチン14のプロモーターの下流にCre recombinaseとエストロゲン受容体の融合タンパクをコードするトランスジェニックマウスを交配させる。このマウスが樹立されれば、tamoxifenを外用した



時間・空間選択的遺伝子欠損マウス

部位で、Wntシグナルを抑制するAPC蛋白の発現を消失されることが期待される。APC遺伝子は $\beta$ -cateninを分解し、Wntシグナルを負に制御しているため、表皮細胞で任意の時期にWntシグナルが活性化させることが可能となる。

マウスの皮膚に良性のpapillomaや真皮の浸潤を引き起こすSCCを誘導可能なDMBA(dimethylbenzanthracene: initiation)-TPA(0-tetradecanoylphorbol-acetate: promotion)を外用し、腫瘍が発生した時点で表皮細胞のAPC遺伝子欠損を誘導し、Wntシグナルを活性化させ、その腫瘍の組織を検討する。

#### 4. 研究成果

Wntシグナルを時間、部位特異的に活性化させたマウスの樹立に成功した。このマウスを組織学的に解析したところ、図1のように野生型マウスに比べ、毛包数が増えており、毛母由来の腫瘍が発生することが判明した。この結果は、Wntシグナルが毛包の誘導の重要であることを直接的に示している。また、毛包間表皮は肥厚しており、表皮の増殖にWntシグナルが関与していることも解明された。

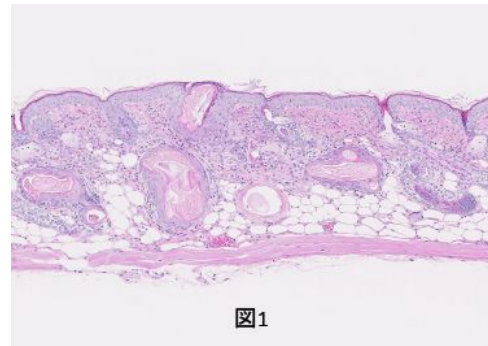


図1

表皮特異的Wntシグナル活性化マウスが樹立されたことが確認できたため、当該マウスにDMBA-TPAを外用し、皮膚腫瘍を発生させ、その発生頻度を検索した(図2)。その結果、図3に示すように、Wntシグナルが活性化したマウスでは、野生型マウスに比べ、腫瘍の発生数、発生時期などに変化はみられなかった。



図2

しかし、興味深いことに、発生した腫瘍を病理組織学的に検討したところ、表皮特異的APC欠損マウスに誘導された皮膚腫瘍は毛包由来であることが判明した。

これらの結果は、Wntシグナルはマウスの皮膚腫瘍発生において、腫瘍の発生率や腫瘍の増殖速度には影響を与えないが、腫瘍の分化方向を変化させることを示している。

また、本研究のもうひとつの目的は、表皮特異的に、任意の時期に、目的となる遺伝子を欠損させる実験系を確立することである。本実験系では皮膚に tamoxifen を外用すると Cre recombinase が核内へ移行し、ターゲットとなる LoxP 配列を切り出す。その結果、目的する遺伝子を欠損させることが期待される。当該マウスでは APC 遺伝子 Exon14 が LoxP 配列に挟まれているので、tamoxifen 外用を行なった際に、表皮特異的に APC 遺伝子を欠損させることが可能である。

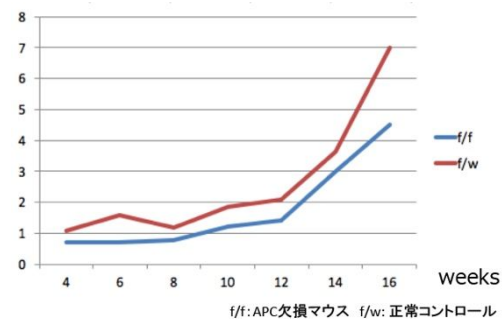


図3

そこで、マウス皮膚に tamoxifen を塗布し、ターゲットとなる APC 遺伝子が欠損しているかどうかを組織学的に検討した。その結果、図4に示すように tamoxifen を塗布した部位に特異的に毛包が増えていることが明らかとなった。この結果から、当該マウスでは tamoxifen 外用により、表皮角化細胞で APC 遺伝子が欠損していることが確認された。すなわち、表皮特異的に、任意の時期に、目的となる遺伝子を欠損させる実験系を確立されたことが明らかとなった。

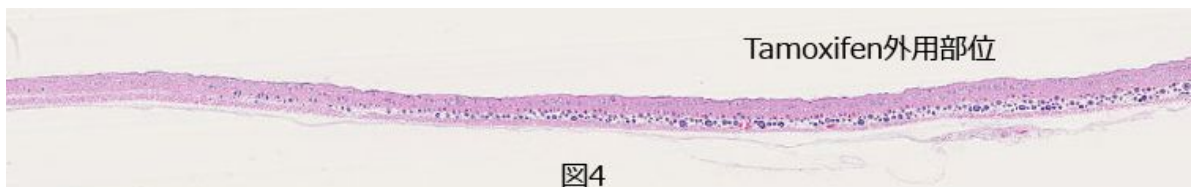


図4

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Harada Kazutoshi, Hiruma Junichiro, Maeda Tatsuo, Tsuboi Ryoji	4. 巻 46
2. 論文標題 Case of tinea manuum transmitted by a hedgehog in an animal cafe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiruma Junichiro, Kitagawa Hiroyuki, Noguchi Hiromitsu, Kano Rui, Hiruma Masataro, Kamata Hiroshi, Harada Kazutoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Terbinafine resistant strain of Trichophyton interdigitale strain isolated from a tinea pedis patient	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Demitsu Toshio, Yamada Tomoko, Umemoto Naoka, Kakurai Maki, Maeda Tatsuo, Harada Kazutoshi, Kawase Masaaki	4. 巻 46
2. 論文標題 Disseminated dermatophytosis due to Nannizzia gypsea ( Microsporum gypseum ) in an elderly patient	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e169 ~ e170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukushi Ruri, Tsuboi Ryoji, Maeda Tatsuo, Kanda Yasuhiro, Sakai Noriyasu, Suzuki Shinji, Harada Kazutoshi	4. 巻 58
2. 論文標題 A case of Kindler syndrome in a young Indian female with exon deletion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e19 ~ e21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijd.14288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hobo Ayako, Harada Kazutoshi, Maeda Tatsuo, Uchiyama Masaki, Irisawa Ryokichi, Yamazaki Masashi, Tsuboi Ryoji	4. 巻 29
2. 論文標題 IL-17-positive mast cell infiltration in the lesional skin of lichen planopilaris: Possible role of mast cells in inducing inflammation and dermal fibrosis in cicatricial alopecia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inozume Takashi, Hanada Ken-ichi, Takeda Kazuyo, Maeda Tatsuo, Harada Kazutoshi, Kawamura Tatsuyoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 expressed by melanoma cells does not affect melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes in the effector phase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14685	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Numata Takafumi, Yoshizaki Takamichi, Yamaguchi Sachiko, Shimura Eri, Iwakura Yoichiro, Harada Kazutoshi, Sudo Katsuko, Tsuboi Ryoji, Nakae Susumu	4. 巻 506
2. 論文標題 IL-36 is involved in hapten-specific T-cell induction, but not local inflammation, during contact hypersensitivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 429 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.10.104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takazawa Maya, Harada Kazutoshi, Kakurai Maki, Yamada Tomoko, Umemoto Naoka, Sakai Toshiyasu, Maeda Tatsuo, Kawase Masaaki, Demitsu Toshio	4. 巻 45
2. 論文標題 Case of pyoderma gangrenosum-like sporotrichosis caused by Sporothrix globosa in a patient with ulcerative colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e226 ~ e227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Harada Kazutoshi, Kato Yuichiro, Maeda Tatsuo, Yoshida Maki, Irisawa Ryokichi, Nagao Toshitaka, Tsuboi Ryoji	4. 巻 44
2. 論文標題 N-Ras mutation in vemurafenib-associated expanding melanocytic nevus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e101 ~ e102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada Kazutoshi, Nakamura Itaru, Gotoh Moritaka, Tsuboi Ryoji	4. 巻 44
2. 論文標題 Pyoderma gangrenosum-like ulcer caused by Helicobacter cinaedi in a patient with hypogammaglobulinemia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e334 ~ e335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Numata Takafumi, Kiryu Shigeru, Maeda Tatsuo, Egusa Chizu, Tsuboi Ryoji, Harada Kazutoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Dermatology	6. 最初と最後の頁 619 ~ 621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Demitsu Toshio, Nagashima Kazutaka, Okabe Taro, Morisawa Yuji, Ishikawa Nobuo, Yagisawa Takashi, Fukuta Hirotaka, Ohtsuki Mamitaro, Kano Rui, Harada Kazutoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Subcutaneous hyalohyphomycosis due to Purpureocillium lilacinum in an immunocompromised patient after renal transplantation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 725 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内山 真樹  (UCHIYAMA MASAKI)  (40420989)	東京医科大学・医学部・助教   (32645)	
研究分担者	前 賢一郎  (MAE KENICHIRO)  (60532257)	東京医科大学・医学部・助教   (32645)	